FastGene™ プラスミドミニキット

用途：ハイコピー／ローコピープラスミド DNA の精製

カタログナンバー : FG-90402（100 preps）

カタログナンバー : FG-90502（300 preps）

保管条件：室温 (15-25℃) で保管して下さい。

FastGene™プラスミドミニキットは、研究目的での使用に限られます。

2013　Nov/Rev.02.2

目次

コンポーネント

FastGene™ プラスミドミニキット	FG-90402 (100 preps)	FG-90502 (300 preps)
FastGene™ mP カラム	100 個	300 個
2 ml コレクションチューブ	100 個	300 個
再懸濁バッファー mP1	25 ml	65 ml
溶解バッファー mP2	25 ml	75 ml
中和バッファー mP3	40 ml	100 ml
第 1 洗浄バッファー mP4	50 ml	130 ml
第 2 洗浄バッファー mP5 濃縮液	25 ml	40 ml
溶出バッファー mP6※1	10 ml	30 ml
RNase A（凍結乾燥）	10 mg	26 mg
LB 培地カプセル※2	10 個	25 個

※1 溶出バッファーの組成は次のとおりです：10mM Tris-Cl, pH8.5（EDTA は含まれておりません）
※2 操作方法は別紙の取扱説明書をご参照ください。

キットに含まれないアイテム

試　薬： 96-100% エタノール
消耗品： 1.5 ml 遠心チューブ、ディスポーザブルピペットチップ
装　置： マニュアルピペット、遠心チューブ用遠心機、ヒートブロック、ボルテックスミキサー
防護用品（白衣、グローブ、ゴーグル）

保管と準備

FastGene™ プラスミドミニキット は、室温 (15-25℃) にて湿気を避けて保管して下さい。この条件でキットを保管した場合、最長 12 カ月間は性能と品質が落ちることなく安定性が保たれます。バッファーを使用する前には、沈殿の有無を確認し、必要に応じて 37℃で再溶解してください。

プロトコルを開始する前に、以下の準備をしてください。

FastGene™ プラスミドミニキット	FG-90402 (100 preps)	FG-90502 (300 preps)
第 2 洗浄バッファー mP5 濃縮液	100 ml のエタノール (96-100%) を添加、混合します	160 ml のエタノール (96-100%) を添加、混合します
再懸濁バッファー mP1 RNase A	1 ml のバッファー mP1 を Rnase A バイアルに加え、ボルテックスミキサーで撹拌します。すべての溶液をバッファー mP1 のボトルに移し、しっかりと混ぜ合わせます。Rnase A 添加後のバッファー mP1 は 4 ℃で保管します。この溶液は、約 6 カ月間は使用できます。	

安全にご使用いただくために ―リスクとアドバイス―

警告：FastGene™プラスミドミニキットは、研究目的での使用に限られます。人や動物の疾病診断目的には、ご使用いただけません。化学物質を取り扱う際は常に、実験に適した白衣、使い捨てグローブ、保護ゴーグルを着用してください。本キットの使用は、ラボ実験の訓練を受けた方が、医薬品安全性試験実施基準に基づいて行うことを強く推奨いたします。

FastGene™プラスミドミニキットの以下のコンポーネントには、下記の物質が含まれております。

溶解バッファー mP2

水酸化ナトリウムを含みます：刺激物

中和バッファー mP3

塩酸グアニジン、酢酸を含みます：刺激物

第 1 洗浄バッファー mP4

塩酸グアニジン、イソプロパノールを含みます：引火性、刺激物

RNase A

リボヌクレアーゼを含みます：刺激物

キットの仕様

FastGene™ プラスミドミニキットは、ハイ / ローコピープラスミド DNA の単離および精製を目的として開発されました。

	ハイコピープラスミド	ローコピープラスミド
最大サンプル量	培養液 1-5 ml	培養液 5-10 ml
一般的な収量	＜ 25µg	＜ 25µg
溶出量	50 µl	50 µl
結合容量	40 µg	40 µg
ベクター	＜ 15 kbp	＜ 15 kbp
所要時間	26 分 / 12 preps	36 分 / 12 preps
フォーマット	スピンカラム	スピンカラム

Fast プロトコル

ー ハイコピープラスミド DNA の精製

精製を開始する前に、RNase A が再懸濁バッファー mP1 に溶解されていることを確認してください。そして、第 2 洗浄バッファー mP5 が「保管と準備」の手順（3 ページ）に従って用意されていることを確認してください。

別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は 13,000 rpm (11,000 – 18,000 G) で行います。

溶解と中和の手順	
1. 大腸菌の培養液1-3 ml（通常は1.5 ml）を、室温（15-25℃）にて>10,000 rpmで1分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。 2. 菌体ペレットを、200 µlの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたはピペッティングで混ぜ合わせることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。 3. 200 µlの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください。**溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。 4. 300 µlの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください。**13,000 rpmで2分間遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、この手順を繰り返してください。	
DNA の結合	
5. FastGene™ mPカラムを、2 mlコレクションチューブの中に入れます。 6. ピペットを使って透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。 7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。	
洗浄	
8. FastGene™ mPカラムに、150 µlの第1洗浄バッファー mP4を加え、メンブレンに吸収させせます（10秒間）。**未だ遠心しないでください。** 9. 更に300µlの第2洗浄バッファー mP5を続けて分注し、溶液を重層します。 10. 13,000 rpmで3分間遠心機にかけます。	
DNA 溶出	
11. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。洗浄バッファーのキャリーオーバーを避けるようにしてください。 12. 50 µlの溶出バッファー mP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。 13. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。 14. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。	

Standard プロトコル

ー ハイコピープラスミド DNA の精製

精製を開始する前に、RNase A が再懸濁バッファー mP1 に溶解されていることを確認してください。そして、第 2 洗浄バッファー mP5 が「保管と準備」の手順（3 ページ）に従って用意されていることを確認してください。

別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は 13,000 rpm (11,000 – 18,000 G) で行います。

溶解と中和の手順	
1. 大腸菌の培養液1-5 ml(通常は1.5 ml)を、室温(15-25° C)にて>10,000 rpmで2分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。 2. 菌体ペレットを、200 µlの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたはピペッティングで混ぜ合わせることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。 3. 200 µlの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください。**溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。 4. 300 µlの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください。**13,000 rpmで2分間遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、この手順を繰り返してください。	
DNA の結合	
5. FastGene™ mPカラムを、2 mlコレクションチューブの中に入れます。 6. ピペットを使って透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。 7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。	
洗浄	
8. 推奨：FastGene™ mPカラムに400 µl の第1洗浄バッファー mP4を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。 （本洗浄ステップは、特にタンパク除去に効果的です。本洗浄ステップを実施することで、純度は向上しますが、プラスミドDNA収量はその分低くなる可能性もあります。DH5αなどの菌株では本ステップをスキップすることが可能ですが、HB101やJMシリーズのようなヌクレアーゼ活性が高い菌株（*end A*+株）などでは、本ステップの実施を強く推奨いたします。） 9. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。 10. FastGene™ mPカラムに600 µlの第2洗浄バッファー mP5を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。 11. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。メンブレンを完全に乾燥させるために、再び2分間遠心機にかけます。	

DNA 溶出	
12. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。洗浄バッファーのキャリーオーバーを避けるようにしてください。 13. 50 µlの溶出バッファー mP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。 14. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。 15. 13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。	

プロトコル

ー ローコピープラスミド DNA の精製

精製を開始する前に、RNase A が再懸濁バッファー mP1 に溶解されていることを確認してください。そして、第 2 洗浄バッファー mP5 が「保管と準備」の手順（3 ページ）に従って用意されていることを確認してください。

別途特別な記載がない限り、通常の卓上型微量遠心機での遠心は 13,000 rpm (11,000 – 18,000 G) で行います。

溶解と中和の手順

1. 大腸菌の培養液10 ml(通常は5 ml)を、室温(15-25° C)にて>10,000 rpmで2分間遠心機にかけてペレット化します。できるだけ上清を取り除きます。
2. 菌体ペレットを、400 µlの再懸濁バッファー mP1（RNase Aを加えたもの）に入れ、ボルテックスまたは上下にピペッティングすることにより再懸濁します。溶解バッファー mP2を加える前に、菌の塊が残っていないことを確認します。
3. 400 µlの溶解バッファー mP2を加え、ゆっくりとチューブを10回ほど転倒混合します。ゲノムDNAが剪断されるのを防ぐために、**ボルテックスはしないでください。**溶解液が透明になるまでの間、溶液を室温にて2分間静置します（5分以上は放置しないでください）。
4. 600 µlの中和バッファー mP3を加え、すぐにチューブを10回ほど転倒混合します。**ボルテックスはしないでください。**13,000 rpmで3分間、遠心機にかけます。上清が透明にならない場合、この手順を繰り返してください。

DNA の結合

5. FastGene™ mPカラムを、2 mlコレクションチューブの中に入れます。
6. ピペットを使って、750 µlの透明な上清をmPカラムに分注し、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
7. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。
8. 残りの透明な上清を同じmPカラムにアプライし、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
9. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。

洗浄

10. FastGene™ mPカラムに400 µl の第1洗浄バッファー mP4を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
11. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。
12. FastGene™ mPカラムに600 µlの第2洗浄バッファー mP5を加え、13,000 rpmで30秒間遠心機にかけます。
13. カラムを通過したろ液を捨て、FastGene™ mPカラムをコレクションチューブに戻します。メンブレンを完全に乾燥させるために、再び2分間遠心機にかけます。

<table>
<tr><th>DNA 溶出</th><th></th></tr>
<tr><td>14. FastGene™ mPカラムを、新しい遠心チューブに移します（遠心チューブはキットに含まれておりません）。
10kb以上のプラスミドDNAの場合、溶出バッファーmP6を予め70℃に加温しておきます。
15. 50 µlの溶出バッファー mP6を、直接メンブレンの中央に加えます。カラムの壁に余分なバッファーが付着しないようにしてください。
16. 溶出バッファーがメンブレンに吸収されるまで、2分間静置します。
17 .13,000 rpmで2分間遠心機にかけ、精製DNAを溶出します。</td><td></td></tr>
</table>

ご注文情報

商品名	カタログナンバー
FastGene™ ゲル /PCR 抽出キット（100 preps）	FG-91202
FastGene™ ゲル /PCR 抽出キット（300 preps）	FG-91302
FastGene™ ゲルバンドカッター（50 本）	FG-830
FastGene™ プラスミドミニキット（100 preps）	FG-90402
FastGene™ プラスミドミニキット（300 preps）	FG-90502
FastGene™ ダイターミネーター除去キット（50 preps）	FG-9411
LB 培地カプセル（100 個）	NE-L2720-100

お問い合わせ

日本ジェネティクス株式会社

【本　　社】
〒112-0004 東京都文京区後楽 1-4-14 後楽森ビル 18 階
TEL：03-3813-0961 FAX：03-3813-0962

【西日本営業所】
〒604-8277 京都市中京区西洞院通御池下ル 565 番地ラフィーネ御池 3 階
TEL：075-257-5421 FAX：075-257-5422

より詳しい製品情報、お問い合わせの詳細、ご質問、トラブルシューティングにつきましては、弊社ウェブサイト（www.n-genetics.com）をご確認ください。

E-mail :info@genetics-n.co.jp